

# 応用生物科学科 2007 年研究業績

## A. 研究発表

### 1. 論文

- (1) Production of bioactive lysophosphatidic acid by lysophospholipase D in hen egg white

Junichi Morishige, Kanako Touchika, Tamotsu Tanaka, Kiyoshi Satouchi, Kenji Fukuzawa, Akira Tokumura

*Biochim. Biophys. Acta*, 1771, 491-499 (2007)

Lysophosphatidic acid (LPA), a lysophospholipid mediator, is produced extracellularly by lysophospholipase D (lysoPLD) secreted in several animal body fluids including blood plasma. Previously, we reported that hen egg white contains polyunsaturated fatty acid-rich LPA. In this study, we examined whether lysoPLD is involved in the production of LPA in hen egg white. LysoPLD activity was measured by determining LPA and choline by mass spectrometric and enzyme-linked fluorometric analyses, respectively. LysoPLD increased with increased dilution of egg white, indicating that one or more components of egg white strongly inhibit its lysoPLD activity. This dilution-dependent increase in the lysoPLD activity was masked by co-incubation of the egg white with lysozyme, a major protein in hen egg white. Furthermore, addition of Zn(2+), Mn(2+), Ni(2+), or Co(2+) to diluted egg white altered preference patterns of lysoPLD toward choline-containing substrates. In particular, the egg white lysoPLD activity was greatly increased when Co(2+) was added. The cation-requirement of lysoPLD activity in hen egg white resembled that of plasma autotaxin (ATX)/lysoPLD. Western blot analysis revealed that egg white contained a protein that was immunostained with anti-ATX antibody. These results suggested that LPA in hen egg white is produced from lysophospholipids, especially LPC, by the action of ATX/lysoPLD, possibly originating from hen oviduct fluid.

- (2) GI-58 facilitates the lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation

Tomohiro Yamaguchi, Naoto Omatsu, Emi Morimoto, Hiromi Nakashima, Kanki Ueno, Tamotsu Tanaka, Kiyoshi Satouchi, Fumiko Hirose, Takashi Osumi

*J. Lipid Res.*, 48, 1078-1089 (2007)

A lipid droplet (LD)-associated protein, perilipin, is a critical regulator of lipolysis in adipocytes. We previously showed that Comparative Gene Identification-58 (CGI-58), a product of the causal gene of Chanarin-Dorfman syndrome, interacts with perilipin on LDs. In this study, we investigated the function of CGI-58 using RNA interference. Notably, CGI-58 knockdown caused an abnormal accumulation of LDs in both 3T3-L1 preadipocytes and Hepa1 hepatoma cells. CGI-58 knockdown did not influence the differentiation of 3T3-L1 adipocytes but reduced the activity of both basal and cAMP-dependent protein kinase-stimulated lipolysis. In vitro studies showed that CGI-58 itself does not have lipase/esterase activity, but it enhanced the activity of adipose triglyceride lipase. Upon lipolytic stimulation, endogenous CGI-58 was rapidly dispersed from LDs into the cytosol along with small particulate structures. This shift in localization depends on the phosphorylation of perilipin, because phosphorylated perilipin lost the ability to bind CGI-58. During lipolytic activation, LDs in adipocytes vesiculate into micro-LDs. Using coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy, we pursued the formation of micro-LDs in single cells, which seemed to occur in cytoplasmic regions distant from the large central LDs. CGI-58 is not required for this process. Thus, CGI-58 facilitates lipolysis in cooperation with perilipin and other factors, including lipases.

- (3) クローブ (*Syzygium aromaticum* L.) 熱水抽出物の高脂肪食摂餌マウスの脂質代謝に及ぼす影響  
吉積一真、平野 薫、富 裕孝、辻 智子、田中 保、里内 清  
生薬学雑誌、61、69-79 (2007)

The effect of a hot water or clove(*Syzygium aromaticum* L.) on serum and hepatic lipids, and fecal triglyceride levels was investigated in mice. The addition of 1.0%(w/w) of the clove hot water extract to a high-fat diet containing 60% (w/w) lard for 28 days significantly increased fecal triglyceride levels, significantly reduced plasma insulin and hepatic total cholesterol levels, and tended to reduce plasma and hepatic triglyceride levels compared with mice given a high-fat diet without the clove hot water extract. Semi-quantitative real time reverse transcription-polymerase chain reaction analysis demonstrated that addition of the clove hot water extract to a high-fat diet increased gene expression of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase and reduced gene expression of fatty acid synthase in the liver. In addition, the clove hot water extract dose-dependently inhibited lipase activity in vitro. It is therefore suggested that the improvement action of lipid metabolism in mice fed a high-fat diet originated from the activation of lipid oxidation,

the inactivation of fatty acid synthesis in the liver, and the inhibition of lipolysis in the small intestine.

- (4) Metabolic pathway that produces essential fatty acids from polymethylene-interrupted polyunsaturated fatty acids in animal cells  
Tamotsu Tanaka, Jun-ichi Morishige, Dai Iwawaki, Terumi Fukuhara, Naomi Hamamura, Kaoru Hirano, Takashi Osumi, Kiyoshi Satouchi  
*FEBS J.*, 274, 2728–2737 (2007)

Sciadonic acid (20:3 Delta-5,11,14) and juniperonic acid (20:4 Delta-5,11,14,17) are polyunsaturated fatty acids (PUFAs) that lack the Delta-8 double bond of arachidonic acid (20:4 Delta-5,8,11,14) and eicosapentaenoic acid (20:5 Delta-5,8,11,14,17), respectively. Here, we demonstrate that these conifer oil-derived PUFAs are metabolized to essential fatty acids in animal cells. When Swiss 3T3 cells were cultured with sciadonic acid, linoleic acid (18:2 Delta-9,12) accumulated in the cells to an extent dependent on the concentration of sciadonic acid. At the same time, a small amount of 16:2 Delta-7,10 appeared in the cellular lipids. Both 16:2 Delta-7,10 and linoleic acid accumulated in sciadonic acid-supplemented CHO cells, but not in peroxisome-deficient CHO cells. We confirmed that 16:2 Delta-7,10 was effectively elongated to linoleic acid in rat liver microsomes. These results indicate that sciadonic acid was partially degraded to 16:2 Delta-7,10 by two cycles of beta-oxidation in peroxisomes, then elongated to linoleic acid in microsomes. Supplementation of Swiss 3T3 cells with juniperonic acid, an n-3 analogue of sciadonic acid, induced accumulation of alpha-linolenic acid (18:3 Delta-9,12,15) in cellular lipids, suggesting that juniperonic acid was metabolized in a similar manner to sciadonic acid. This PUFA remodeling is thought to be a process that converts unsuitable fatty acids into essential fatty acids required by animals.

- (5) Tissue-specific expression of rice CYP72A21 induced by auxins and herbicides  
Sakiko Hirose, Hiroyuki Kawahigashi, Akemi Tagiri, Hiromasa Imaishi, Hideo Ohkawa, and Yasunobu Ohkawa  
*Plant Biotechnol. Rep.* 1, 27–36 (2007)

Cytochrome monooxygenase P450s (CYPs) comprise one of the largest enzyme families in plants. Some P450s are involved in xenobiotic metabolism: they confer herbicide tolerance and are induced by chemical treatments. We isolated a novel P450 cDNA, CYP72A21 (accession number, AB237166), from rice (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare)

seedlings treated with a mixture of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), chlorotoluron, phenobarbital, salicylic acid, and naphthalic anhydride (each 100  $\mu$ M). We also isolated the gene's promoter region. Endogenous CYP72A21 expression in rice seedlings treated with 2,4-D, herbicides esprocarb, or trifluralin was increased in the aerial part of seedlings. An expression plasmid, pI21pg, containing the GUS gene under the control of the CYP72A21 promoter was introduced into rice plants. GUS was expressed constitutively in roots, but this expression was suppressed by 2,4-D treatment. 2,4-D and other auxins induced GUS expression effectively in the stem and leaves. Histological observation revealed that GUS was expressed mainly in the base of the stem. Treatment with the herbicides acetochlor, esprocarb, and propyzamide induced GUS expression in the aerial parts of the seedlings. The CYP72A21 promoter was highly responsive to treatments with various chemicals, and thus might be useful for producing transgenic plants for biomonitoring of environmental chemicals.

- (6) Herbicide resistance of transgenic rice plants expressing human CYP1A1  
Hiroyuki Kawahigashi, Sakiko Hirose, Hideo Ohkawa, Yasunobu Ohkawa  
*Biotechnology Advances*, 25, 75–84 (2007)

Cytochrome P450 monooxygenases (P450s) metabolize herbicides to produce mainly non-phytotoxic metabolites. Although rice plants endogenously express multiple P450 enzymes, transgenic plants expressing other P450 isoforms might show improved herbicide resistance or reduce herbicide residues. Mammalian P450s metabolizing xenobiotics are reported to show a broad and overlapping substrate specificity towards lipophilic foreign chemicals, including herbicides. These P450s are ideal for enhancing xenobiotic metabolism in plants. A human P450, CYP1A1, metabolizes various herbicides with different structures and modes of herbicide action. We introduced human CYP1A1 into rice plants, and the transgenic rice plants showed broad cross-resistance towards various herbicides and metabolized them. The introduced CYP1A1 enhanced the metabolism of chlorotoluron and norflurazon. The herbicides were metabolized more rapidly in the transgenic rice plants than in non-transgenic controls. Transgenic rice plants expressing P450 might be useful for reducing concentrations of various chemicals in the environment.

- (7) Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated reporter gene expression systems in transgenic tobacco plants  
S. Kodama, K. Okada, H. Inui and H. Ohkawa  
*Planta*, 227, 37–45 (2007)

In mammals, the aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediates expression of certain genes, including CYP1A1, in response to exposure to dioxins and related compounds. We have constructed a mouse AhR-mediated gene expression systems for a  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gene consisting of an AhR, an AhR nuclear translocator (Arnt), and a xenobiotic response element (XRE)-driven promoter in transgenic tobacco plants. On treatment with the AhR ligands 3-methylcholanthrene (MC),  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$  NF), and indigo, the transgenic tobacco plants exhibited enhanced GUS activity, presumably by inducible expression of the reporter gene. The recombinant AhR (AhRV), with the activation domain replaced by that of the Herpes simplex virus protein VP16, induced GUS activity much more than the wild-type AhR in the transgenic tobacco plants. Plants carrying AhRV expressed the GUS reporter gene in a dose- and time-dependent manner when treated with MC; GUS activity was detected at 5 nM MC on solid medium and at 12 h after soaking in 25  $\mu$  M MC. Histochemical GUS staining showed that this system was active mainly in leaf and stem. These results suggest that the AhR-mediated reporter gene expression system has potential for the bioassay of dioxins in the environment and as a novel gene expression system in plants.

(8) Molecular Characterization of Specifically Active Recombinant Fused Enzymes Consisting of CYP3A4, NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase, and Cytochrome b<sub>5</sub>

H. Inui, A. Maeda and H. Ohkawa

*Biochemistry*, 46 (35), 10213–10221 (2007)

Microsomal cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) catalyzes monooxygenase reactions towards a diverse group of exogenous and endogenous substrates, and requires cytochrome b<sub>5</sub> (b<sub>5</sub>) in the oxidation of the typical substrate testosterone. To analyze the molecular interaction among CYP3A4, NADPHcytochrome P450 oxidoreductase (P450 reductase), and b<sub>5</sub>, we constructed several fused enzyme genes and expressed them in *Saccharomyces cerevisiae*. The recombinant fused enzymes CYP3A4-truncated (t) P450 reductase-t-b<sub>5</sub> (3RB) and CYP3A4-t-b<sub>5</sub>-t-P450 reductase (3BR) in yeast microsomes showed a higher specific activity in 6 $\beta$ -hydroxylation of testosterone than did the reconstitution premixes of CYP3A4, P450 reductase, and b<sub>5</sub>. The purified fused enzymes exhibited lower K<sub>m</sub> values and substantially increased V<sub>max</sub> values in 6 $\beta$ -hydroxylation of testosterone and oxidation of nifedipine. Moreover, the fused enzymes showed significantly higher activities in cytochrome c reduction than the reconstitution premixes. Although the affinity of 3RB

toward cytochrome c was twice that of 3BR, 3BR and 3RB showed nearly the same affinity toward NADPH/NADH. In addition, the heme of the CYP3A4 moiety of 3RB was reduced preferentially and more rapidly than that of 3BR, whereas the heme of the b5 moiety of 3BR was selectively reduced as compared with that of 3RB. These results suggest that the conformation of the 3RB molecule was the most suitable for high activity due to appropriate ordering of the CYP3A4, P450 reductase, and b5 moieties for efficient electron flow. Thus, we believe that the b5 moiety plays an important role in the efficient transfer of the second electron in the vicinity of the CYP3A4 moiety.

- (9) Expression and Physiological Function of CYP4F Subfamily in Human Eosinophils  
Yasushi Kikuta, Junji Mizomoto, Henry W. Strobel, Hideo Ohkawa  
*Biochimica et Biophysica Acta*, 1771, 1439–1445 (2007)

We investigated expression of the CYP4F subfamily in human leukocytes by flow cytometry using anti-CYP4F3A antibody and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (QRT-PCR). More than 90% of CD11b, CD13, CD14, CD33, and eosinophil marker-positive cells expressed CYP4F3A. mRNA for CYP4F3A was found in neutrophils, monocytes, and eosinophils. CYP4F12 mRNA was detected in eosinophils and neutrophils. In eosinophils, transcription of the *CYP4F12* gene was started from two sites at 49 and 85 nucleotides upstream from the 3' end of exon I. Recombinant CYP4F12 expressed in yeast cell microsomes catalyzed the  $\omega$ -hydroxylation of leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) and 6-*trans*-LTB<sub>4</sub>. In contrast, the CYP4F12 did not show any activity toward eicosanoids such lipoxin A<sub>4</sub> and 12-HETE, which are substrates for CYP4F3A, indicating that the physiological roles of CYP4F3A and CYP4F12 in eosinophils are different.

- (10) Catalytic characterization and cytokine mediated regulation of cytochrome P450 4Fs in rat hepatocytes  
Aunash Kalsotra, Sayeepriyadarshini Anakk, Chad L. Bromer, Yasushi Kikuta, Edward T. Morgan, and Henry W. Strobel  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 461, (1) 104–112 (2007)

Cytochrome P450 (CYP) 4F mediated leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) metabolism modulates inflammation during injury and infection. Here we show that in addition to LTB<sub>4</sub>, the recombinant rat CYP4Fs catalyze  $\omega$ -hydroxylations of lipoxin A<sub>4</sub>, and hydroxyeicosatetraenoic acids. CYP4F gene regulation studies in primary hepatocytes reveal that pro-inflammatory cytokines interleukin (IL) -1 $\beta$ , IL-6 and tumor necrosis factor

(TNF) - produce a general inductive response whereas IL-10, an anti-inflammatory cytokine, suppresses CYP4F expression. The molecular mechanism behind IL-6 related induction of CYP4F4 and 4F5 is partially signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) dependent. When hepatocytes are subjected to high concentrations of LTB<sub>4</sub> of prostaglandin E<sub>2</sub>, lipid mediators of inflammation, only an increase in CYP4F5 mRNA expression is observed. Collectively, the results from isozyme activity and substrate driven CYP4F induction do not support the notion that an autoregulatory pathway could control the excessive concentrations of LTB<sub>4</sub> during an inflammatory challenge to hepatocytes.

(11) Staling and texture of bread prepared from new Japanese bred wheat varieties with slightly low-amylose starch

Miwako Ito, Sun-Ju Kim, Zaidul-Islam Sarker, Naoto Hashimoto, Takahiro Noda, Shigenobu Takigawa, Chie Matsuura-Endo, Tetsuya Horibata, Yoshiko Nakaura, Naoyoshi Inouchi, Michihiro Fukushima and Hiroaki Yamauchi  
*Food Sci. Technol. Res.*, 13, 121-128 (2007)

The bread-making quality of flour made from two new Japanese bread wheat varieties, Haruyokoi and Kitanokaori, was evaluated, and the staling and texture of bread made from these flour types were compared with those of flour made from representative bread wheat classes, No.1 Canada western red spring (1CW) and Hard red winter (HRW). There was not a large difference in the bread-making quality of the above four flour types, except that the water absorption of the Kitanokaori flour was high, and the gassing power of the dough was low. Bread made from the two above-mentioned Japanese flour types (two new bread varieties) were quite soft after baking, and the degree of staling (changes in hardness) were somewhat lower than those made with 1CW and HRW. The cohesiveness of the two new bread varieties, i.e., the index of bread elasticity, showed higher values than those of others up to 1 day of storage. From the analysis of bread staling and the retrogradation of starch in bread, it was proven that the staling rate and starch retrogradation rate constants of the two new bread varieties were approximately the same as those of bread made from 1CW and HRW but the starch retrogradation of the new bread varieties was somewhat slower than that of the others up to 2 days of storage. The analysis of hardness and cohesiveness of the flour and starch gel from the above four flour types indicated that the softness and high cohesiveness of the two new bread varieties after baking were, to a great extent, the result of the soft texture of starch gel in these varieties. These results showed that the somewhat slow staling, especially staling in the early stage, and the extreme softness after baking of the two new bread varieties were attributed to the soft texture and low retrogradation of

starch gel in the bread, which was related to the lower amylose content of these new flour types.

(12) Biological pretreatment with two bacterial strains for enzymatic hydrolysis of office paper

Masahiro Kurakake, Nozomi Ide, and Toshiaki Komaki

*Current Microbiology*, 54, 424-428 (2007)

The Cellulose-hydrolyzing strains, *Sphingomonas paucimobilis* MK1 and *Bacillus circulans* MK2 were separated from soil, which were grown together in a single culture plate. Growth of *Bacillus circulans* MK2 in liquid culture required symbiosis with *Sphingomonas paucimobilis* MK1. Biological pretreatment with the combined strain suspension after the liquid culture improved enzymatic hydrolysis of office paper, municipal wastes. Sugar recovery by *Sphingomonas paucimobilis* MK1 (51%) was 1.4 times higher than that of the untreated sample (30%); and in the strain combination with *Bacillus circulans* MK2, recovery was further improved by 2.5 times (75%). The sugar recovery in maximum condition was enhanced up to 94% for office paper. Furthermore, Biological pretreatment effects were confirmed for more than 1 day of shorter time. In X-ray diffraction patterns for the crystallinity of cellulose in office paper changed following biological pretreatment, the crystallinity was increased in comparison to that in untreated paper. The mechanism of biological pretreatment effect was explained by that the strain had an action as an endo-glucanase which hydrolyze amorphous area randomly.

## 2. 報文

(1) ダイオキシン類モニタリング用植物の実用化

大川 秀郎

2006年度生研センター研究成果発表会(東京)、p. 53-54(2007-3)

(2) 産地の異なる食用カンナの澱粉の構造と物理化学的性質との関係

(Relationship between structure and physicochemical properties of starches of edible canna in different place.)

中浦嘉子、倉掛昌裕、田中伸幸、井ノ内直良

福山大学生命工学部年報(6), 25 - 34 (2007)

台湾、ミャンマー、ベトナム、インドネシアのアジア各地で栽培された食用カンナ



について、その澱粉の構造と糊化物性との関係を調べた。カンナ澱粉の 85°C の熱水中での溶解度はポテト澱粉と同様に高かった。膨潤力はポテト澱粉が 64.1g/g であるのに対して、13.7-25.2 g/g と低く、ノーマルコーン澱粉に比較的近かった。ベトナム産は食用カンナ澱粉の中では比較的高い膨潤力と低い溶解度を示した。DSC 分析において、ポテト澱粉に比べカンナ澱粉の吸熱量は低かったが、糊化ピーク温度はポテト澱粉の 63.9°C に比べカンナ澱粉ではいずれも 65.8°C 以上と高く、その中でも台湾産が最も高い 72.0°C の値を示した。これはアミロペクチン結晶部が、より強固な構造であるためと考えられた。食用カンナ澱粉粒のグルコアミラーゼによる消化性はポテト澱粉粒よりも低く、その中でも台湾産が最も低かった。澱粉のアミロース含量はベトナム産およびインドネシア産の 2 種が高く、特にベトナム産は 31.1% とノーマルコーン澱粉よりも高かった。台湾産カンナではアミロースとアミロペクチン側鎖の中間画分が 16.5% と他のものと比べ 1.5-2.1 倍程度高かった。HPAEC-PAD 法により、台湾産カンナのアミロペクチン側鎖は重合度 23-37 の長鎖画分が多いことが認められた。産地の異なるカンナ澱粉は、食品素材として汎用されるポテトおよびノーマルコーン澱粉と異なる物性を示し、またその産地によってもその性質は異なった。各産地での特性を活かすことで食用カンナの新たな食品素材としての可能性が示唆された。

### 3. 口頭発表

- (1) 消化プロセスで生じる創傷治癒ホルモン・リゾホスファチジン酸による消化管組織修復  
田中 保、堀内 剛、平野 薫、徳村 彰、盛重純一、小池 透、Mandi Murph、Gordon Mills、里内 清  
第 48 回日本生化学会中国・四国支部例会（高知）プログラム・講演抄録 p. 51, (2007-5)
- (2) ウコギ葉サポニンによるリパーゼ阻害と抗肥満作用  
平野 薫、吉積一真、辻 智子、田中 保、里内 清  
第 48 回日本生化学会中国・四国支部例会（高知）プログラム・講演抄録 p. 56(2007-5)
- (3) 食品に含まれる創傷治癒ホルモン・リゾホスファチジン酸  
田中 保、堀内 剛、平野 薫、菊田安至、里内 清、徳村 彰、盛重純一、小池 透  
日本脂質栄養学会第 16 回大会（島根）脂質栄養学、16, p. 164 (2007-9)

リゾホスファチジン酸 (LPA) は特異的受容体を介し、様々な細胞応答を誘導する活性リン脂質である。この増殖因子様リン脂質は血液凝固の際に効率よく産生され、線維芽細胞や上皮細胞の増殖や運動を刺激すると共に血管新生を促進することによって、創傷の治癒を促進する。我々は食品や漢方薬に含まれる LPA を定量し、その生物作用を評価した。

- (4) 線虫 (*C. elegans*) に見出されたホスホリパーゼ A1  
炭山隆雄、平野 薫、田中 保、里内 清、松崎浩明、秦野琢之  
日本農芸化学会 2007 年度 中四国・西日本支部合同大会 (山口)  
講演要旨集 p. 35 (2007-9)
- (5) Effect of lysophosphatidic acid in digested cabbage leaf on damaged tissue.  
Tamotsu Tanaka, Gou Horiuchi, Kaoru Hirano, Kiyoshi Satouchi, Junichi Morishige, Akira Tokumura, Tohru Koike, Mandi Murph and Gordon Mills  
第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会年会 合同大会 (神奈川) 講演要旨集 p. 731 (2007-12)

Lysophosphatidic acid (LPA) is a growth-factor-like lipid that is thought to play a role in the process of wound healing. Previously, we demonstrated that significant amounts of LPA were present in several vegetables.

- (6) ヘミンによる血管内皮細胞に対する障害性の検討  
瓜倉真衣、松原主典、赤木玲子  
第 48 回日本生化学会中国・四国支部例会 (高知) 講演要旨集 p. 50 (2007-5)
- (7) ヘミン誘導性 HO-1 が血管内皮細胞に及ぼす影響  
瓜倉真衣、浦山絵美、松原主典、森将晏、赤木玲子  
第 4 回 Heme Oxygenase 研究フォーラム (京都) 講演抄録集 p. 9 (2007-8)

組織が損傷されると溶血が起こり、局所的に遊離ヘム濃度が上昇する。ヘムは強力なプロオキシダントでもあるため、種々な細胞内へとただちに取り込まれ、ヘム分解系酵素である Heme Oxygenase (HO) の誘導型アイソザイムである HO-1 により分解される。この反応は生理学的に重要な一酸化炭素 (CO) やビリベルジン (BV) を生成し、BV はさらにビリルビン (BR) へと変換される。BV/BR は内因性抗酸化物質として知られ、CO は血管拡張作用を持つことから、HO-1 は血管新生 (angiogenesis) にとって重要であると考えられているが、不明な点も残されてい

る。更に、障害時に活発化する未分化細胞からの血管発生 (vasculogenesis) に及ぼす HO-1 誘導の影響は解明されるべき課題である。我々は、血管発生および血管新生に対するヘム代謝の影響を検討する目的で、各々マウス embryonic stem (ES) cell およびヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて検討を行った。

(8) Effects of HO-1 induction by hemin on vascular endothelial cells

Mai Urikura, Emi Urayama, Kiminori Matsubara, Reiko Akagi

HO Conference 2007- The 5th International Congress (Cracow, Poland) p.192  
(2007-9)

Tissue injuries accompanied by hemorrhage cause local release of heme. Since free heme is a potent pro-oxidant, it is immediately taken up by various cells, followed by degradation by induced heme oxygenase-1 (HO-1). This reaction produce physiologically important substances such as carbon monoxide (CO), iron, biliverdin (BV), which is then converted to bilirubin (BR). Considering that BV/BR are intracellular anti-oxidant system and CO has vasodilator effect, HO-1 is thought to play an important role in angiogenesis. However, the role of HO-1 in vasculogenesis has not been fully investigated. In this study, we examined the effect of HO-1 induction on neovasculogenesis by using human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and ES cells.

(9) 血管形成における遊離ヘムの影響

瓜倉真衣、浦山絵美、松原主典、森将晏、赤木玲子

第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会年会合同大会講演要旨集 p. 675  
(2007-12)

Tissue injuries accompanied by hemorrhage cause local release of heme. On the other hand, hemin infusion for treatment of porphyria often causes local injury of vascular endothelial cells. Since free heme is immediately taken up by various cells, followed by degradation by induced heme oxygenase-1 (HO-1), HO-1 is thought to play an important role in angiogenesis. However, the role of free heme in vasculogenesis has not been fully investigated. In this study, we examined the effect of free heme on neovasculogenesis by using human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and murine ES cells.

(10) ダイオキシン類モニタリング用植物の実用化

大川 秀郎

2006年度生研センター研究成果発表会(東京)(2007-3)

- (11) 残留性有機汚染物質のバイオアッセイ方法の開発

大川 秀郎

日本化学会第 87 春期年会(大阪) (2007-3)

- (12) Bioassays for persistent organic pollutants in receptor-mediated reporter gene expression systems

H. Ohkawa, H. Inui, Y. Tanaka

American Chemical Society 233<sup>rd</sup> National Meeting and Exposition (Chicago, Illinois), p.105 (2007-3)

Contamination of the environment and agricultural products with persistent organic pollutants (POPs) including dioxins and organochlorine insecticides is a serious problem in the world. These chemicals are found in the environment and agricultural products at nano-level concentrations. They accumulate at extremely high levels on the top of food chains and expand to the whole earth particularly through aquatic ecosystems. Therefore, it is important to monitor these residues on-site and at real-time. In general, a high performance GC/MS is used for analysis of POPs. Some POPs specifically bind to a receptor and then induce the expression of certain genes, resulting in their toxicity and/or other biological activities in animals. On the other hand, certain ground plant species have deeply spread roots. These plants can absorb and accumulate nano-level chemicals from a wide area through their root systems. Therefore, we attempted to introduce an animal receptormediated reporter gene expression system into plants for the development of bioassay systems of POPs. The transgenic plants with an aryl hydrocarbon receptor (AhR)- or an estrogen receptor (ER)-mediated reporter gene expression system were generated and evaluated as bioassay systems of POPs. The bioassays appear to be useful for the fast screening of POP monitoring.

- (13) 組換え型 AhR/レポーター遺伝子系を付与発現した組換え植物を用いたダイオキシン類のバイオケミカルアッセイ方法の開発

大川 秀郎

生物化学的測定研究会 第 12 回 (2007 年) 学術集会 (広島) (2007-6)

- (14) Biomolecular Assays For Persistent Organic Pollutants

Hideo Ohkawa

Symposium on Frontiers in the Interface between Life Science and Chemistry (沖縄) (2007-5)

Contamination of the environment and agricultural products with persistent organic pollutants(POPs) including dioxins and organochlorine insecticides is serious problem in the world. These chemicals were found in the environment and agricultural products at nano-level concentrations. However, these chemicals are suspected to accumulate at extremely high levels on the top of food chains and to expand in the whole earth particularly through aquatic ecosystems. Therefore, it is important to monitor these residues on site and at real time. In general, a high performance GC/MS method is used for analysis of POPs in environmental samples.

Some of POPs specifically bind to a receptor and then induce the expression of certain genes, resulted in their toxicity and/ or other biological activities in animals. On the other hands, certain plant species are grounding and have spreading deep roots. These plants can absorb and accumulate nano-level chemicals from a wide area through spreaded root systems, but have not had any receptor for POPs. Therefore, we attempted to introduce an animal receptor-mediated reporter gene expression system into higher plants for development of biomolecular assays for POPs.

The transgenic plants with an aryl hydrocarbon receptor(AhR)- or estrogen receptor(ER)-mediated reporter gene expression system were generated and evaluated for biomolecular assays for POPs. The assays based on molecular mechanisms of modes of toxic actions of POPs in animals seem to be useful for the fast screening of POP monitoring.

- (15) マウス及びモルモットのアリルヒドロカーボン受容体/レポーター遺伝子系を導入した形質転換植物による残留性有機汚染物質のバイオアッセイ  
祇園 景子、若井 丈人、金 倫碩、殷 熙洙、乾 秀之、大川 秀郎  
日本農芸化学会 2007 年度大会 (東京) (2007-3)

[目的]残留性有機汚染物質(POPs)の環境汚染と生体影響の実態把握が求められている。そこで、アリルヒドロカーボン受容体(AhR)を用いて、レポーター遺伝子の誘導発現を基に POPs をバイオアッセイする形質転換植物の作出・評価を試みた。[方法]マウスとモルモットの AhR のリガンド結合領域に LexA DNA 結合領域と VP16 転写活性化領域を結合した組換え型 AhR 遺伝子と GUS レポーター遺伝子を導入した形質転換タバコとシロイヌナズナを作出した。形質転換植物をポリ塩化ビフェニル(PCB)、DDT などを含む培地、あるいは、採取したダイオキシン類汚染土壌で育成し、GUS 活性を測定した。[結果]形質転換植物において毒性の強い PCB126 の処理による GUS 活性の増加が認められたが、毒性の弱い PCB180 の処理では増加しなかった。また、実際のダイオキシン類汚染土壌で栽培した場合、顕著な GUS

活性の増加が認められた。本研究は生研センター基礎研究推進事業及び科研費基盤(A)の補助を受けて行った。

(16) CYP4F 酵素のヒト白血球における発現と機能の解析

菊田 安至、溝本 淳史、八塚 裕樹、大川秀郎

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会・合同大会(神奈川)、  
講演要旨集 p. 560 (2007-12)

We performed quantitative analysis of the expression of the CYP4F subfamily members in human leukocytes by flow cytometry using anti-CYP4F3 antibody and QRT-PCR. More than 90% of neutrophil marker and eosinophil marker-positive cells expressed CYP4F3. mRNA for CYP4F3 was found in neutrophils, monocytes, and eosinophils. CYP4F12 mRNA was detected in eosinophils and neutrophils. In HL60 cells (clone 15), treatment with retinoic acid induced transcription of the *CYP4F3* and *CYP4F12* genes, and *n*-butyrate treatment enhanced expression the *CYP4F12* gene. In eosinophils, transcription of the *CYP4F12* gene was started from two sites at 49 and 85 nucleotides upstream from the 3' end of exon I. Recombinant CYP4F12 in yeast microsomes catalyzed the  $\omega$ -hydroxylation of leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) and 6-*trans*-LTB<sub>4</sub>. In contrast, the CYP4F12 did not show any activity toward eicosanoids such as lipoxin A<sub>4</sub> and 12-HETE, which are substrates for CYP4F3.

(17) 湯種パンの物性・老化に対するデンプンの影響

大内幸太、小田有二、中浦嘉子、堀端哲也、井ノ内直良、山内宏昭

日本農芸化学会 2007 年度大会(東京)講演要旨集 p. 139 (2007-3)

【目的】現在湯種製法による食パンが広く市販されており、風味・食感が良く、老化しにくいとされている。我々はこの湯種食パンの老化を速度論的に解析したところ、老化速度は遅くその主因の一つが製パン時の吸水増加にあるという結果を得た。本研究では更に、湯種食パンにおいて、デンプンの状態、物性、老化速度等の検討を行い、湯種食パンの特異な物性・老化に対するデンプンの影響について解析した。【方法・結果】小麦粉ベースで湯種を、製パン時に用いる小麦粉量の 0、20、40%になるように添加し、ノータイム法で製パンした。これらのパンを 0-4、10 日保存して脱水粉末を調製し、これを用い膨潤度の測定、X 線回折、DSC 分析をおこなった。またパン生地、パン、デンプンの走査電子顕微鏡写真をとり比較した。その結果、湯種添加量が増加すると、膨潤度は増加し、X 線回折では大きな差がなかったが、DSC 分析では吸熱ピークのデータからデンプンの老化速度

は遅くなることがわかった。また SEM 写真から特に湯種添加 40% 生地に違いが見られた。

- (18) 澱粉の生合成・構造研究の進歩- 主として米アミロペクチンの構造研究について  
井ノ内直良、第 47 回澱粉研究懇談会（静岡）資料集 p. 82-88 (2007-6)

- (19) 日本の在来イネ・コアコレクションの米胚乳澱粉と炊飯米の性質  
野末祥子、平塚真遊、中浦嘉子、梅本貴之、井ノ内直良  
日本応用糖質科学会平成 19 年度大会(神奈川) Journal of Applied Glycoscience,  
54, Suppl. p. 34 (2007-8)

【目的】我が国の農業生物資源ジーンバンク事業により選定された日本の在来イネ・コアコレクションの試料米を用いて、精白米の尿素液中での崩壊性、胚乳澱粉の性質、米飯物性、遺伝子型などを調べ、それらの関連性を明らかにすることを目的とした。【方法】試料米として日本の在来イネ・コアコレクションの 39 品種を用いた。精白米の尿素液中での崩壊性、および胚乳澱粉のヨウ素・澱粉複合体吸収曲線、見かけと真のアミロース含量、アミロペクチンの超長鎖含量、キャピラリー電気泳動によるアミロペクチンの単位鎖長分布、RVA による粘度特性、DSC による糊化特性などを調べた。米飯物性は(株)サタケ製の「硬さ・粘り計」RHS1A を用いて測定した。

【結果】試料米 39 品種の内訳は、糯米 8 種、通常のアミロース含量の粳米 27 種、高アミロース米 4 品種であり、低アミロース米は存在しなかった。高アミロース米 4 品種(赤米-2、赤米-1、唐法師、唐干)と粳米 3 品種(渡舟、八束穂、山田化)の胚乳澱粉の糊化温度は高く、アミロペクチンの側鎖長は長く、精白米の尿素液中での崩壊性はいずれも難であった。炊飯米の硬さは米胚乳澱粉の見かけのアミロース含量が高いほど増加した。また、冷飯の硬さは、アミロース含量の影響に加えて、アミロペクチンの側鎖長分布によっても大きく影響を受けた。

- (20) 側鎖長分布の異なる米アミロペクチンの微細構造  
井ノ内直良、木本大輔、堀端哲也  
日本応用糖質科学会平成 19 年度大会(神奈川) Journal of Applied Glycoscience,  
54, Suppl. p. 27 (2007-8)

【目的】米アミロペクチン(AP)の超長鎖含量およびクラスターを形成している側鎖長分布は、米澱粉のアミロース含量とともに、米澱粉の物性および米飯物性に大きな影響を及ぼす。今回、それら AP 構造の両側面を幅広くカバーする 10 種類

の米試料を用いて、AP 側鎖の全体の平均鎖長、平均内部・外部鎖長、AP のクラスターを形成している内部鎖長分布の微細構造を調べることを目的とした。【方法】モチ米 [ヒヨクモチ、紅染めもち(高温糊化赤米)] とウルチ米 [研系 2064(*ae* 変異体米)、アケノホシ(高温糊化米)、カサラス(高温糊化赤米)、ベニロマン(高温糊化赤米)、日本晴、ホシユタカ(高アミロース米)、夢十色(高超長鎖米)、あゆのひかり(糖質米)] の合計 10 種類の米試料を用いた。これら米試料の AP の枝切り生成物から AP の平均側鎖長、AP の  $\beta$ -limit dextrin(LD) の枝切り生成物の平均側鎖長の測定により AP の平均内部・外部鎖長を求めた。また AP の  $\beta$ -LD の枝切り生成物の還元処理後の HPAEC-PAD により AP の内部鎖長分布を調べた。【結果】AP の平均鎖長は *ae* 変異体米の研系 2064(27.1) が最も高く、次いで超長鎖含量の高い夢十色(24.4)、カサラス(23.1)、ベニロマン(22.8)、ホシユタカ(22.0) が高い値を示し、日本晴(20.2)、ヒヨクモチ(20.3) は低い値を示した。平均外部鎖長は 13~18 と米試料間で違いがみられたが、平均内部鎖長は 6~8 と違いはわずかであった。ただし、糊化温度の高い米品種(紅染めもち、アケノホシ、カサラス、ベニロマン)の AP に B 鎖由来の非常に短い内部鎖(DP4~7) が比較的多く観察された。

(21) アミロペクチンクラスターの側鎖長分布が特異な米の胚乳澱粉の構造と物性および炊飯物性

井ノ内直良、上田知幸、中浦嘉子、岡本和之、平塚真遊、梅本貴之  
日本食品科学工学会第 54 回大会 (福岡) 講演集 p.51 (2007-9)

【目的】わが国の研究機関では、米の消費拡大を目指して多様な形質の米品種の開発が行われている。現在、わが国ではほとんどコシヒカリのように粘りの強いジャポニカ (一般にアミロペクチンクラスター(APC)が短い) タイプの米品種が栽培されているが、海外では主として粘りの弱いインディカ (一般に APC が長い) タイプの米品種が栽培されている。今回、APC の側鎖長分布が特異な米の胚乳澱粉の構造と物性および炊飯物性を調べることを目的とした。

【方法】精白米の 5M 尿素液中での崩壊性がジャポニカ米とインディカ米の中間型の陸稲 4 品種 (北海赤毛、改良 13 号、近成純 1 号、最上近成 1 号) の胚乳澱粉の性質および炊飯物性を、水稻 4 品種 (ジャポニカ米: 日本晴、ヒノヒカリ、早不知、インディカ米: カサラス) と比較した。胚乳澱粉は精白米から冷アルカリ浸漬法により調製した。胚乳澱粉のヨウ素・澱粉複合体吸収曲線、酵素・クロマト法による真と見かけのアミロース含量およびアミロペクチンの超長鎖含量、キャピラリー電気泳動によるアミロペクチンの鎖長分布、DSC による糊化温度と糊化熱量、RVA による粘度曲線、老化澱粉の離水率などを測定した。また、硬さ・粘り計により炊飯米と冷飯の物性測定を行った。



【結果】陸稲 4 品種の胚乳澱粉の真のアミロース含量とアミロペクチンの超長鎖含量はそれぞれ 18.4–23.1%、2.0–2.2%、対照品種の水稻 4 品種はそれぞれ 16.8–20.2%、0.8–7.5% の範囲内で観察された。陸稲 4 品種の胚乳澱粉の APC の側鎖長、超長鎖含量、RVA のセットバック、炊飯米および冷飯の硬さと粘りなどの性質は、いずれもジャポニカ米の日本晴とインディカ米のカサラスの間に位置するユニークな特徴を示した。これらの結果から、今回調べたような特性をもつ陸稲品種は、今後、わが国の多様な形質をもった米品種の育成材料として有用であると考えられる。

- (22) Characterization of starch granules from subtropical plant tubers and roots  
Meng Xu, Sigetomo Yonemori, Naoyoshi Inouchi, Chikage Kikuta, Masako Kawanishi and Yotaro Konishi, 10<sup>th</sup> Asian Congress of Nutrition, Abstract Book p. 232, (Taipei, Taiwan) (2007–9)

The aim of this study is to exploit functional starch for food or industrial uses from spontaneous plants in the subtropics. Starch granules were isolated from tubers or roots of *Dioscorea pseudojaponica* Hayata (Keelung yam), *D. bulbifera* L., *Alocasia macrorrhiza* (L.) Schott., *Colocasia esculenta* Schott. var. *aquatilis* (wet taro), *Maranta arundinacea* L. (arrowroot), and *Smilax nervo-marginata* Hayata in the Iriomote Island, Japan. Among these samples, starch granules from Keelung yam had unique properties, as follows. (1) The bimodal distribution in granule size (19–24  $\mu\text{m}$  and 157–200  $\mu\text{m}$  in diameter) was shown. (2) The amylose content was 21.5%. (3) The gelatinization temperature was found to be 82.8  $^{\circ}\text{C}$  by differential scanning calorimetry, which was higher than that of *A. macrorrhiza* (64.6  $^{\circ}\text{C}$ ) or sweet potato (73.7  $^{\circ}\text{C}$ ). (4) The percentage of short chain units (DP=6–12) of the debranched amylopectin was 10.8%, lower than that of sweet potato (19.1%) or wet taro (23%) by anion exchange chromatography with a pulsed amperometric detector. (5) The digestibility of the starch granules by glucoamylase for 5h was 19.6%, lower than *D. bulbifera* (53.8%) or arrowroot (73.1%). Thus, some subtropical tubers or roots, Keelung yam in particular, have a potential for starch resources.

- (23) Fine structure and physicochemical properties of rice starches  
Naoyoshi Inouchi, Tetsuya Horibata, Hideo Hibi, Yoshiko Nakaura, and Tomio Itani  
Proceedings of Starch Update 2007, The 4<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology, Bangkok, Thailand, p. 63–66, (2007–11) (Invite lecture)

Starch granules were prepared from mature grains of cultivars of rice originating in Japan and the other countries. The apparent and true amylose contents, chain-length distributions of amylopectin, thermal and pasting properties have been investigated. The rice starches were mainly classified into two types, L-type (long type) and S-type (short type), based on the differences in the chain length of the amylopectin cluster. The L-type rice mainly belonged to *indica*, and the S-type rice to *japonica*. The non-waxy cultivars of the *indica* and *Chinese indica* had mainly higher contents of the apparent amylose and super-long chains (SLC) of amylopectin, and decreased amounts of branch chains with DP 6-12 (Fr.A). The Fr.A contents correlated positively with the alkali spreading score of rice grains and negatively with peak temperature of gelatinization of the rice starches. The setback and breakdown measured by RVA showed high positive and negative correlations with SLC contents, respectively, and both peak top viscosity and breakdown negatively correlated to apparent amylose contents. There was a high positive relationship between amounts of waxy (*Wx*) protein and SLC contents in starch. This appears to show that *Wx* protein is concerned with synthesis of SLC. SLC contents in starches of rice originating in many countries were evenly observed in the range of 0.0-13.4%. There were large amounts of inner short B chains in L-type of rice amylopectin. Such branching patterns in short B chains may affect the degree of retrogradation of L-type of rice.

- (24) *Klebsiella pneumoniae* 由来 プルラナーゼの N1 ドメインの役割  
掛谷真伍、佐藤祐子、西村寿弘、山岸幸正、三輪恭彦、廣瀬順造、岩本博行  
日本農芸化学会中四国支部創立5周年記念第17回講演会（高松）（2007-1）
- (25) The EPR spectra of the Enzyme-Substrate (Lys-Ala-Naphthylamide) Complex in  
Cu(II)-Dipeptidyl Peptidase III  
Junzo Hirose, Chie Kawaoka, Tomohiro Ikeura, Hiroyuki Iwamoto, and Kayoko  
M. Fukasawa  
第17回 金属の関与する生体関連反応シンポジウム（京都）（2007-6）  
薬学雑誌 Vol.127、 Suppl. 2、 p. 46（2007）
- (26) The EPR spectra of the Enzyme-Substrate (Lys-Ala-Naphthylamide) Complex in  
Cu(II)-Dipeptidyl Peptidase III.  
Junzo HIROSE  
The 13th International Conference on Bioinorganic Chemistry (ICBIC 13) Vienna,  
Austria, (2007-7) (Invite lecture).

Dipeptidyl peptidase III (DPP III), which has a HELLGH...E (residues 450-455, 508) motif as the zinc-binding site, is classified as a zinc metallopeptidase, but the zinc-binding motif (HExxxH (x: appropriate amino acid)) of DPP III is different from a common zinc-binding motif (HExxH) such as that of thermolysin. The  $\text{Cu}^{2+}$  derivatives of thermolysin and carboxypeptidase A do not have enzyme activities. As reported previously, the  $\text{Cu}^{2+}$  derivative of DPP III has high enzyme activity and we showed that the motif part of DPP III directly influences the expression of the enzyme activity in the copper derivative of DPP III. For Arg-Arg-naphthylamide, the value of  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  of  $\text{Cu(II)-DPP III}$  was 1/3 that of  $\text{Zn(II)-DPP III}$ . Lys-Ala-naphthylamide was also the good substrate for  $\text{Cu(II)-DPP III}$  but slowly digested at low temperature by  $\text{Cu(II)-DPP III}$ . The EPR spectra of  $\text{Cu(II)-DPP III}$  mixed with substrate (1-10 mM), Lys-Ala-naphthylamide, at low temperature and immediately frozen in liquid nitrogen were measured and were different from that of  $\text{Cu(II)-DPP III}$ . The EPR spectra of the substrate- $\text{Cu(II)-DPP III}$  complex gradually change to original EPR spectrum of  $\text{Cu(II)-DPP III}$  when the substrate- $\text{Cu(II)-DPP III}$  complex were incubated at 10 °C. These results clearly indicated that the substrate- $\text{Cu(II)-DPP III}$  complex could be measured as EPR spectrum.

(27) プルラナーゼの基質結合クレフトに突き出た Phe 残基の役割

岩本博行、掛谷真伍、森本武史、佐藤祐子、山岸幸正、三輪泰彦、廣瀬順造、Domingus Malle、三上文三、勝矢良雄

日本応用糖質科学会平成 19 年度大会(神奈川) Journal of Applied Glycoscience, 54, Suppl. p. 34 (2007-8)

[目的] 演者らはこれまで、デンプン枝切り酵素における基質特異性発現機構について解明するため、*Klebsiella* 及び *Bacillus* 由来プルラナーゼ (KPP および BSP) の X 線結晶構造解析を行ってきた。これら酵素の活性中心付近の構造を、既に構造の明らかになっている *Pseudomonas* 由来イソアミラーゼと比較すると、プルラナーゼ間でのみ保存され、基質結合クレフトに側鎖を突きだした Phe 残基が存在することが分かった。そこで本研究では、この残基がアミロペクチンのような嵩高い基質が酵素に結合する際、立体障害になっているのではないかと考え、変異酵素を作成して当該残基の役割について検討した。

[方法と結果] KPP の Phe765 を Ala に置換した変異酵素 (KPP-F765A) を定法に従い作成した。また BSP についても同様の変異酵素を作成した。基質特異性を調べるための基質として、プルラン、アミロペクチン、グリコーゲン、 $\beta$ -リミットデキストリン (LD) を用い、還元糖の生成速度から反応速度を求めた。アミロペク

チンはアルカリ糊化後中和して用いた。KPP-F765A の各基質に対する  $K_m$ 、 $k_{cat}$  を調べたところ、予想に反していずれの基質に対しても野生型酵素と変異酵素の間に有意な  $K_m$  値の違いは見られなかった。 $k_{cat}$  に関しては、アミロペクチンでは大きな違いは見られなかったが、プルランと LD に対して、野生型酵素に比べて F765A の  $k_{cat}$  が 1/3 程度に低下していた。一方、シクロデキストリンによる阻害では、両酵素間で大きな違いが見られた。

- (28) Dipeptidylpeptidase III 中の亜鉛イオンを銅イオンで置き換えた Cu-Dipeptidylpeptidase III の性質—EPR から見た基質との相互作用—  
廣瀬 順造、岩本 博行、深澤 加典子  
食品酵素化学研究会（京都）講演要旨集 p. 3 （2007-9）
- (29) 金属ペプチダーゼの亜鉛結合部位とその性質  
廣瀬順造、深澤加典子  
酵素化学ミニシンポジウム「酵素化学において過去十年間に解明されこと、今後 10 年間に解明すべきこと」（京都）講演要旨集 p. 3 （2007-9）
- (30) アミノペプチダーゼ B の点変異実験による基質特異性の研究  
Identification of an amino acid residue of Aminopeptidase B involved in binding to the substrate  
深澤加典子、廣瀬順造、秦季之、小野行雄  
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会（横浜）講演要旨集 p. 578 （2007-12）

Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6, ApB) specifically cleaves *in vitro* the N-terminal Arg or Lys residue from peptides and synthetic derivatives. Ap B was shown to have a consensus sequence found in the metallopeptidase family. We determined the putative zinc binding residues (His324, His328 and Glu347) and the essential Glu325 residue for the enzyme using site-directed mutagenesis [Fukasawa KM et al (1999) *Biochem. J.* 339, 497-502]. And recently, the Asp 405 residue on ApB was identified to be involved in substrate binding via interaction with the P1 amino group of the substrate's side chain [Fukasawa KM et al (2006) *Biochemistry* 38, 11425-11431]. To study the structure of substrate binding domain of Ap B more precisely, several amino acid residues which were presumed to contain the active domain of ApB, were replaced some different kind of amino acid and the kinetic parameters of these mutants were determined. The rule of the Gln170 and Lys599 residues on ApB are discussed in comparison with those of

(31) 水中におけるエピガロカテキンガレートおよびガロカテキンガレートとカフェインとの相互作用

石津 隆、梶谷真也、平田千賀子、山本英二

日本薬学会第 127 年会講演要旨集 p. 182 (2007-3)

【目的】緑茶に含まれるカテキン類 エピガロカテキンガレート(EGCg)、および3位の立体配置のみが異なるガロカテキンガレート(GCg)とカフェインとの水中における相互作用の相違について詳細に比較検討した。

【方法および結果】EGCg と等モルのカフェインを水に溶解すると粘着状の沈殿を与えた。NMR による解析の結果、この沈殿には EGCg とカフェインが 1:1 の比率で存在し、それに水を含み錯体を形成しているものと考えられる。それに対して、GCg と等モルのカフェインを水に溶解してもこのような沈殿は与えなかった。

【考察】NOE 測定の結果、GCg は B 環と B'環の間に比較的大きなスペースを生じるのに対して、EGCg ではあまり大きなスペースを生じない。EGCg のこのスペースはカフェイン 1 分子を挟み込むように取り込むのに適したサイズであり、水分子を含み EGCg とカフェインが 1:1 錯体を形成していると推測される。

(32) トリアシルグリセロールの結晶化に及ぼす圧力の影響

山本 英二、石本 裕一、安部 伸宏、松井 岐美、村田 哲章、高橋 俊介

化学工学会第 38 回秋季大会(札幌) 研究発表講演要旨集 H103 (2007-9).

1 種類の TAG を常温圧力下でも結晶化しない菜種油と混合した液を油脂のモデルとして使用して、多形の圧力温度相図を測定し、核化挙動についても検討し、所望の大きさの微粒子の生成をするための基礎データを得た。トリパルミチン 10% と菜種油の混合油脂の場合の圧力・温度相図を作成した。平衡圧力を常圧まで外挿すると  $\alpha$  形と  $\beta$  形のそれぞれの融点 44°C、55°C に近いことからそれぞれの多形の圧力・温度相図と見なした。 $\alpha$  形の平衡圧力よりも高い圧力で保持したときの待ち時間の逆数 ( $\propto$  核化速度) は飽和圧力  $\Delta P$  [MPa] の指数関数的に増加していることがわかったことは、圧力による油脂の結晶化における粒子サイズの制御に役立つと考えられる。

(33) 緑茶に含まれる (-)-Epigallocatechin gallate と Caffeine との相互作用の解明

石津隆、梶谷真也、堤広之、山本英二

第 45 回日本薬剤会日本病院薬剤師会中四国支部学術大会 (高知)

(34) 放線菌由来  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼの性質

神原良和、松谷友美、藤井智将、倉掛昌裕

日本農芸化学会 2007 年度大会 (東京) 講演要旨集 p. 208 (2007-3)

【目的】 土壌より分離した放線菌 I10-1 株はアラビノキシランからアラビノースを遊離する  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼを生産した。この酵素の各種アラビノキシランに対する反応性およびその酵素遺伝子について調べた。

【方法】 I10-1 株の液体培養は 1%アラビノキシラン、0.5%酵母エキス、0.2%リン酸水素 2 ナトリウム 12 水和物の培地にて、30°C、140rpm で行った。培地液量を 100ml とし、500ml 容三角フラスコにて 72 時間培養し、粗酵素を調製した。 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ活性は 4%アラビノキシラン溶液に pH5、40°C で作用させ、生成するアラビノース量を HPLC (カラム:GL-C610 [日立化成]) で定量することで求めた。ここで 1 分間に 1  $\mu$ mol のアラビノースを生成させる酵素量を 1U と定義した。

【結果】 調製した I10-1 株酵素をアラビノース組成の高いとうもろこし種子および小麦由来のアラビノキシラン(Ara/Xyl=0.5-0.6)に作用させたところ、約 40%のアラビノースをほぼ選択的に遊離させたが、それ以上に反応は進まなかった。この未反応のアラビノキシランについての分析を行った。

(35) *Aspergillus oryzae* KB の 2 種  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼの性質

小川顕二、瀧口隆一郎、杉江基希、倉掛昌裕

日本農芸化学会 2007 年度大会 (東京) 講演要旨集 p. 208 (2007-3)

【目的】 *Aspergillus oryzae* KB は 2 種の  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ F1 および F2 を生産した。F1 はフルクトース転移性の高い酵素であるのに対し、F2 は加水分解性の高い酵素であった。ここでは両酵素生産性と培地の糖組成変化との関係について調べた。*Aspergillus oryzae* 全ゲノム情報をもとに、RT-PCR による両酵素遺伝子の発現条件について調べその発現との関連性についても検討した。

【方法】 KB 株の液体培養はシュクロース 0.5-10%、酵母エキス 1%、リン酸水素 2 ナトリウム 12 水和物 0.2%の培地にて、30°C、140rpm で行った。培地液量を 30ml とし、100ml 容三角フラスコにて培養した。KB 株  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼの活性は 20%シュクロースに、pH5、40°C、60 分で作用させ、生成糖を HPLC (カラム:NH2P-50 [旭化成]) により分析することで求めた。

【結果】5%シュクロース培地では培養日数に伴い、糖転移性の高いF1酵素の生産性が高くなったが、培養液中のオリゴ糖の生成は培養初期にしか確認できなかった。高分子のフルクタンにまで変換されたと考えられたのでその有無について酸分解法を用いて調べた。

(36) *Agrobacterium* sp D2 株の多糖生産性とその構造について

倉掛昌裕、森山晋伍、時藤千歳、神田浩幸

日本応用糖質科学会平成19年度大会（神奈川）

Journal of Applied Glycoscience, 54, p. 31 (2007-8)

【目的】土壌より分離した *Agrobacterium* sp D2 株は平板培地にてグルコースから粘性多糖類を効率よく生産した。この多糖類は透明で粘性が高いものであったが、加熱による不溶化がないためカードランではないものと思われた。ここではD2株の多糖類生産性のための液体培養条件について検討した。また、その粘性多糖類の分離を行い構造について調べた。

【方法】D2株の液体培養は1%グルコース、0.5%酵母エキスの培地を用い、培地液量を100mlとし、500ml容三角フラスコにて30°C、140rpmで行った。3~7日間液体培養し、その遠心上清中の多糖類をアルコール沈殿させた後、希硫酸を加え100°Cにて酸分解し、遊離する構成単糖類を分析した。糖分析にはHPLC（カラム:GL-C610 [日立化成]、カラム温度60°C、キャリアー 蒸留水、流速1ml/min）を用いた。生成糖量を多糖量に換算し、液体培養における多糖類生産性について評価した。

【結果】D2株生産多糖類を酸分解したところ、主としてグルコースが検出された。また、ラミナリアーゼによる加水分解性が認められ、 $\beta$ -1,3結合を有する構造であることが確認できた。D2株の液体培養での多糖類生産性は培養3日で増加し、炭素源のグルコース培地濃度に伴って増加した。4%グルコース培地にて生産量は培養液1L当り約2g程度となった。

(37) 酵素法による農産・都市廃棄物の有用物質への変換

倉掛昌裕

広島バイオテクノロジー推進協議会 記念講演（広島）(2007-6)

(38) 農産廃棄物の有効利用について

倉掛昌裕

「アグリ事業を支える研究開発に関する研究会」

近畿中国四国農業試験研究推進会議（福山大学）(2007-8)

(39) 高圧力を利用した充填豆腐の製造条件

安川景子、治部祐里、栗田寛子、槇尾幸子、寺本あい、三宅由紀子、淵上倫子  
日本家政学会第 59 回大会（岐阜）、研究発表要旨集 P101（2007-5）

豆乳を高圧処理することにより、従来の加熱凝固法より省エネルギータイプの製造方法を検討した。最初に市販豆腐の物性測定、微細構造の観察、官能評価を行い、次に豆乳 300g に凝固剤（塩田にがり液体）4g または 6g 添加して、加圧（400～600MPa、25℃または 50℃で 10 分～60 分）及び加熱（88℃で 30 分～60 分）凝固豆腐を作成し、外観写真の撮影、物性測定、微細構造の観察、官能評価を行い比較した。

(40) キサンタンガム添加した市販高齢者用トロミ調整食品のレオロジーと官能評価  
治部祐里、栗田寛子、安川景子、太田実花、槇尾幸子、寺本あい、溝手千賀子、三宅由紀子、淵上倫子

日本家政学会第 59 回大会（岐阜）、研究発表要旨集 P102（2007-5）

5 種類の増粘剤を水（砂糖、食塩、食酢添加）、牛乳で低、中、高濃度とし、25℃、60℃でレオロジー測定した。砂糖、牛乳では粘度増加し温度の影響を受けた。キサンタンガムは加工デンプンやグアーガムより調味料の影響が著しく小さかった。チクソトロピー性はキサンタンガムとグアーガムで優れていた。キサンタンガムは透明度、味、香りで良い評価を得た。加工デンプンとグアーガムはオレンジジュースや緑茶の味を変化させた。

(41) High-pressure- induced Yuzu Marmalade

Hiroko Kuwada, Yuri Jibu, Keiko Yasukawa, Sachiko Makio, Ai Teramoto and Michiko Fuchigami

The 14<sup>th</sup> Gums and Stabilisers Conference (Wrexham, UK)（2007-6）

柑橘類はペクチンを多く含むため、加熱によりマーマレードが作られる。加熱すると香りが消失し苦味が増す。クエン酸に浸漬して果実を軟化させペクチンを溶出させた後、高圧力処理することにより、風味のよいユズジャムをつくる方法について検討した。

(42) Texture and Structure of High-pressure-induced Tofu

Keiko Yasukawa, Yuri Jibu, Hiroko Kuwada, Sachiko Makio, Yukiko Miyake, Ai Teramoto and Michiko Fuchigami



The 14<sup>th</sup> Biennial International Congress Asian Regional Association for Home Economics (ARAHE) p.17 (Kuala Lumpur, MALAYSIA) (2007-8)

市販豆腐と同じ凝固剤 (4g) 添加の加圧凝固豆腐は軟らかいが、加熱凝固豆腐や凝固剤 6g 添加の加圧凝固豆腐は、硬く舌触りが悪いとの評価だった。豆乳 300g に凝固剤 4g 添加し、600MPa、50℃で 30 分加圧処理、あるいは豆乳 300g に凝固剤 4g 添加し、500MPa、50℃で 60 分加圧処理した豆腐が、表面が滑らかで程よい硬さに凝固し、微細構造においても気泡が小さくタンパク質のゲルネットワークが均質で、軟らかく舌触りが良かった。

- (43) 清水白桃の成熟・保蔵・煮熟による軟化とペクチン質の関係  
安川景子、治部祐里、栗田寛子、楨尾幸子、寺本あい、渡邊直子、淵上倫子  
日本調理科学会 (東京)、平成 19 年度大会研究発表要旨集 P-17 (2007-8)

清水白桃の成熟 (硬熟・完熟・過熟の 3 段階)、保蔵 (追熟、21℃)、煮熟による軟化と、ペクチン質組成および組織構造 (クライオ走査電子顕微鏡観察) の変化との関係について検討した。

- (44) Structure and Texture of Pressure-shift-frozen Fresh Cheese  
Yuri Jibu, Hiroko Kuwada, Keiko Yasukawa, Sachiko Makio, Yukiko Miyake, Ai Teramoto and Michiko Fuchigami  
10<sup>th</sup> Asian Congress of Nutrition (Taipei, TAIWAN) ABSTRACT BOOK p. 228 (2007-9)

水分含量の多いフレッシュチーズは凍結後の損傷が大きい。不凍域である -10℃、100MPa、-15℃150MPa にカッテージチーズ、マスカルポーネチーズ、モッツァレラチーズを保持した後、急激に圧力解除して圧力移動凍結し、大気圧下の圧力容器内凍結、フリーザー凍結したものと比較した。解凍後の物性、離水率、氷結晶とゲルの微細構造の変化、官能評価により、圧力移動凍結の優位性を明らかにした。

- (45) うどんの組合せ食のグリセミックインデックス  
石井香代子、守谷聡美  
平成 18 年香川県栄養改善学会 (香川) 講演要旨集 p. 32-33 (2007-2)

- (46) うどんと食育  
吉原良一、石丸芳樹、石井香代子、岩本仟子

- (47) 組合せうどん食の血糖上昇の違い  
石井香代子、川井泉、守谷聡美、福家みゆき  
第 6 回日本 Glycemic Index 研究会 (東京) 講演要旨集 p. 15 (2007-7)
- (48) 麺類摂取における血糖変化  
石井香代子、川井泉、守谷聡美  
第 54 回日本栄養改善学会学術総会 (長崎) 講演要旨集 p. 224 (2007-9)

香川県で日常的に摂取されているうどんをうどんと副菜を組み合わせた食事として取りあげ、摂取後の血糖上昇の違いや血中脂質の変化などについて調査検討した。対象に健康な女性 8 名 (29.4±13.2 歳)、BMI は 21.6±2.5kg/m<sup>2</sup> で肥満状態を示すものはいなかった。実験対象食は、基準食(きつねうどんとおでん)、検査食(かき揚げうどんとおでん)とし、エネルギー 500kcal で栄養素のエネルギー比率は、たんぱく質 15%、脂質約 20%、炭水化物 60%などとし栄養価を揃え、食物繊維量をそれぞれ 4.1g、8.7g とした。血糖値は摂食前(空腹時)と食後 6 回、血中インスリン・血中脂質は食前と食後 2 時間の計 2 回静脈より採血し検査した。結果として、血糖上昇曲線から、基準食と検査食に大きな違いは認められなかったが、食後 45 分に検査食に低値傾向(p=0.051)認められた。総コレステロールは、検査食で有意に低値を示した(p<0.05)。麺類は、一般的に血糖上昇は米飯やパンに比較し緩やかであり、GI 値も低いことが知られているが、麺類同士の比較もさらに検討して食事として全般的に血糖値への影響や効果を調査したい。

## B. 総説

## C. 著書

- (1) Bioassay of Persistent Organic Pollutants in Transgenic Plants with Ah Receptor and GUS Reporter Genes  
H. Inui, K. Gion, Y. Utani and H. Ohkawa  
in "Pesticide Chemistry" Eds by H. Ohkawa, H. Miyagawa and P.W. Lee,

Wiley-Vch, Weinheim, Germany, p. 431-438 (2007)

(2) Structural and physicochemical characteristics of endosperm starches of rice cultivars recently bred in Japan

Naoyoshi Inouchi, Tetsuya Horibata, Yoshiko Nakaura and Hidetsugu Fuwa  
in "Starch: Achievements in Understanding of Structure and Functionality"  
Eds by V. Yuryev, P. Tomasik, E. Bertoft, Nova Science Publishers, Inc., U. S. A.  
p. 65-85 (2007)

Structural and physicochemical properties of rice starches were investigated using four types of endosperm starches (*i.e.*, waxy, low amylose (AM), medium AM, and high AM starches) of rice cultivars recently bred in the agricultural experiment station of the Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries of Japan and harvested mainly in 1998 and 1999. There was a highly negative relationship between the true AM contents and the peak viscosity measured by a Rapid Visco Analyser (RVA) for non-waxy starches. In the group of high AM starches, there were two types of rice starch samples with similar apparent AM contents (about 30%), different contents of super-long chains (SLC) in amylopectin (AP), and different values in the peak viscosity and setback of starches measured by RVA. Since there was a highly positive relationship between SLC contents and setback, the SLC in AP seems to have a great influence on the setback of starch. Both of side-chain length distribution within the short-chain range of AP and the SLC content of AP greatly influence the gelatinization temperature of rice starches. The SLC in AP contributed to neither swelling nor dissolution of the rice starches in water at 75 °C. We proposed a scheme for the relationship between the SLC and Fr.A (DP 6-12) contents of AP as a classification of endosperm starches of rice cultivars recently bred in Japan. There were significant differences among the setback values of the starches plotted into three zones determined by the SLC contents in the scheme.

(3) 食品ハイドロコロイドの開発と応用 Food Hydrocolloids : Development and Applications, 監修: 西成勝好、第3章 多糖類ハイドロコロイド  
1 澱粉、井ノ内直良、平島 円、p. 150 - 167、シーエムシー出版

澱粉の基礎 (はじめに、澱粉研究の歴史と現状、澱粉の特殊性と多様性、澱粉の分子構造、澱粉の構造と物性との関係) について概説した。

## D. その他

- (1) 野菜に含まれる創傷治癒成分・リゾホスファチジン酸による消化管組織修復  
里内 清、平野 薫、田中 保  
平成 17-18 年文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 (C) 報告書 p. 1-48  
(2007)
- (2) DHA  
里内 清 監修  
いきいき健康生活, 1月号 p.13 (2007)
- (3) 加工業務用低コスト栽培適性多収品種の米胚乳澱粉の性質解明  
井ノ内直良  
平成 18 年度 (独) 農業・食品産業技術総合研究機構プロジェクト研究「低コスト  
で質の良い加工・業務用農産物の安定供給技術の開発」4系(稲)推進会議(茨城)  
推進会議資料、p. 44-45 (2007-2)